บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
กล้องจุลทรรศน์ Labophot II	Nikon, Japan
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX	Varian, U.S.A.
เครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ(auto sampler) รุ่น 8200CX	Varian, U.S.A.
แคปพิลลารีคอลัมน์(capillary column) ชนิด carbowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 60 ม.	Restex, U.S.A.
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน(hydrogen generator) รุ่น 9200	Packard, U.S.A.
เครื่องอัดอากาศ(air compressor) รุ่น WL 505000 AJ	Campbell Hausfeld, U.S.A.
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ(psychotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบหมุน (rotary)	New Brunswick Scientific, U.S.A.
เครื่องชั่งละเอียด(analytical balance) รุ่น A200S	Sartorius, Germany
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorius, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่นCentrikon T-42K	Kontron, Italy
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่นJ-30I	Beckman, U.S.A.
เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophillizer) รุ่น Eyela FD-1	Tokyo Rikakikai, Japan
เครื่องวัดปริมาณอิออน(ion meter) รุ่น 69 หัววัดแอมโมเนียมอิออน (ammonium probe) รุ่น 35-6050	ESD, U.S.A.
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง(VIS spectrophotometer) รุ่น Novaspec II	Pharmacia Biotech, England
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง(pH meter) รุ่น 2000	Cyberscan, Singapore
เครื่องหล่อเย็นหมุนเวียน(circulation cooler)	Marubishi, Japan

1.1 อุปกรณ์ (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต
ชุดสกัดสาร (soxhlet apparatus) ขนาด 1000 มิลลิลิตร	BRAND, Germany
ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น Eyela MBF500-ME ชุดควบคุม รุ่น EPC1000 และ เครื่องอัดอากาศ รุ่นMAU-2	Tokyo Rikakikai, Japan
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	ISSCO, U.S.A.
ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น BM800	Memmert, Germany
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL60	Memmert, Germany
ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL80	Memmert, Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760	Memmert, Germany
เครื่องหล่อเย็นหมุนเวียน(circulation cooler) รุ่น CA-1100	Tokyo Rikakikai, Japan

1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
กรดซัลฟูริกเข้มข้น[H_2SO_4]	E. Merck Damstadt, Germany
กรดบอริก[H_3BO_3]	E. Merck Damstadt, Germany
กรดเบนโซอิก [$C_7H_6O_2$]	Fluka, Japan
กรดโอเลอิก [$C_{18}H_{34}O_2$]	E. Merck Damstadt, Germany
กรดไฮโดรคลอริก[HCl]	E. Merck Damstadt, Germany
คลอโรฟอร์ม [CH_3Cl]	E. Merck Damstadt, Germany
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต [$CaCl_2.2H_2O$]	E. Merck Damstadt, Germany
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต [$ZnSO_4.7H_2O$]	Carlo Erba, Italy
ซูโครส (น้ำตาลทราย)	มิตรผล ประเทศไทย
ซูโครส [$C_{12}H_{22}O_{11}$]	E. Merck Damstadt, Germany
โซเดียมคลอไรด์ [NaCl]	ปรุงทิพย์ ประเทศไทย
ไตร-โซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต [$Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$]	Carlo Erba, Italy

1.2 เคมีภัณฑ์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
โซเดียมโพรพิโอเนต [$C_3H_5O_2Na$]	Fluka, Germany
โซเดียมวาเลอเรต [$C_5H_9O_2Na$]	E. Merck Damstadt, Germany
โซเดียมอะซิเตต	Carlo Erba, Italy
โซเดียมไฮดรอกไซด์ [NaOH]	Carlo Erba, Italy
ไดคลอโรมีเทน [CH_2Cl_2]	E. Merck Damstadt, Germany
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [Na_2HPO_4]	Fluka, Germany
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต [$NiCl_2.6H_2O$]	E. Merck Damstadt, Germany
พอลิไฮดรอกซีบิวทิเรต	Sigma Chemical, U.S.A.
พอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-14% 3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต)	Aldrich Chemical, Japan
พอลิเปปโตน (polypeptone)	Becton Dickinson, U.S.A.
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต [KH_2PO_4]	Univar, Australia
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต [$FeSO_4.7H_2O$]	Unilab, U.S.A.
เมทานอล [CH_3OH]	E. Merck Damstadt, Germany
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต[$MgSO_4.7H_2O$]	Carlo Erba, Italy
ยูเรีย [N_2H_4CO]	E. Merck Damstadt, Germany
ยูเรียเอส(EC 3.5.1.5)	E. Merck Damstadt, Germany
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	Difco, U.S.A.
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Deutsche Hefewerke Gmbh & Co.
อะซีโตน [C_3H_6O]	J.T. Baker, U.S.A.
อินเวอร์เทส (gradeV EC3.2.1.26)	Sigma Chemical, U.S.A.
เอทานอล [C_2H_5OH]	E. Merck Damstadt, Germany
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$]	J.T. Baker, U.S.A.
เฮกเซน [C_6H_{14}]	Lab-Scan, Ireland

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BA-019 แยกและคัดเลือกโดย รัตนศิริ มุทิตากุล (2538)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อคือนิวเตรียนท์อการ์ (nutrient agar) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

พอลิเปปโตน	5	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน

3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) ใช้สูตรของ Doi และคณะ (1986) ปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลิเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.2 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน ส่วนน้ำตาลแยกละลายและนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตพอลิเมอร์ คือ อาหาร MSM (Mineral Salt Medium) ปรับปรุงโดย สุดา สุภาชวินสวัสดิ์ (2542) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	20.0	กรัม
ยูเรีย	1.14	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3.0	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1.0	มิลลิลิตร

แยกละลายเกลือแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตและ trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกัน ปรับ pH ที่เหมาะสม และนึ่งฆ่าเชื้อที่ภาวะมาตรฐาน

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	20.0	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1.3	กรัม
เฟอร์ริกซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.2	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดตเตตระไฮเดรต	0.6	กรัม
กรดบอริก	0.6	กรัม

4. วิธีการเก็บรักษาเชื้อและเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (sub culture) ทุก 3 เดือน

4.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ กระจายเชื้อ (resuspend) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5

5. วิธีดำเนินการวิจัย

5.1 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเติบโต

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 4.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (2 เปอร์เซนต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ในขวดทดลองปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาน้ำหนักเซลล์แห้ง

การศึกษาในถังหมักแบบแบช

5.2 การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารตั้งต้นต่อการผลิต P(3HB-co-3HV)

เลี้ยงกล้าเชื้อตามข้อ 5.1 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตตามข้อ 3.3 ปริมาตรอาหารเริ่มต้น3 ลิตร มีน้ำตาลทราย (เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ 3HB) ปริมาณคงที่ 20 กรัมต่อลิตร และมีสารตั้งต้นเพื่อการสังเคราะห์ 3HV (โซเดียมโพรพิโอเนต และโซเดียมวาเลอเรต) แปรความเข้มข้นของสารตั้งต้นเท่ากับ 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 กรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.00 $\pm$ 0.05 และค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) ไม่ต่ำกว่า 60 เปอร์เซนต์ของอากาศอิ่มตัว ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนโดยโมลของ 3HV และปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือ

5.3 การศึกษาผลของชนิดและปริมาณของเกลือของกรดอินทรีย์และกรดอินทรีย์บางชนิดต่อการผลิต P(3HB-co-3HV)

เลี้ยงกล้าเชื้อตามข้อ 5.1 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเริ่มต้น 3 ลิตร มีน้ำตาลทรายปริมาณคงที่ 20 กรัมต่อลิตรและมีสารตั้งต้นเพื่อการผลิต 3HV ที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 เติมโซเดียมซิเตรต โซเดียมอะซิเตต หรือกรดโอเลอิก แปรความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.00 ± 0.05 และค่าออกซิเจนละลายไม่ต่ำกว่า 60 เปอร์เซนต์ของอากาศอิ่มตัว ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนโดยโมลของ 3HV และปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือ

5.4 การศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิต P(3HB-co-3HV)

เลี้ยงกล้าเชื้อตามข้อ 5.1 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเริ่มต้น 3 ลิตร น้ำตาลทรายปริมาณคงที่ 20 กรัมต่อลิตร สารตั้งต้นเพื่อการผลิต 3HV ที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 แปรอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 4 8 15 30 60 และ 100 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.00 ± 0.05 และค่าออกซิเจนละลายไม่ต่ำกว่า 60 เปอร์เซนต์ของอากาศอิ่มตัว ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนโดยโมลของ3HV และปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือ

การศึกษาในถังหมักแบบเฟดแบช

เลี้ยงกล้าเชื้อตามข้อ 5 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเข้มข้น0.5 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักเซลล์แห้ง) ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิต (ปรับปรุงแล้วตามผลจากข้อที่ 5.2-5.4) เริ่มต้น 2 ลิตร ควบคุมการป้อนอาหารเข้าสู่ถังหมักโดยใช้ pH-stat เป็น feedback parameter นั่นคือเมื่อมีการใช้สารอาหารหมดไป ค่าความเป็นกรด-ด่างจะเพิ่มสูงขึ้น จึงมีการป้อนอาหารเข้าเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.00 ± 0.05 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าออกซิเจนละลายไม่ต่ำกว่า60 เปอร์เซนต์ของอากาศอิ่มตัว ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

5.5 การศึกษาผลของอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารป้อนเข้าต่อการผลิต P(3HB-co-3HV)

ใช้อาหารเพื่อการผลิตเป็นอาหารป้อนเข้า มีความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นของสารตั้งต้นเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมกับน้ำตาลทราย (ผลตามข้อ 5.2) แปรอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนของอาหารป้อนเข้าเท่ากับ 15 30 และ 60 เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.00 ±0.05 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen) ไม่ต่ำกว่า 60 เปอร์เซนต์ของอากาศอิ่มตัว ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนโดยโมลของ3HV และปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือ

5.6 การศึกษาผลของความเข้มข้นของอาหารป้อนเข้าต่อการผลิต P(3HB-co-3HV)

ใช้อาหารเพื่อการผลิตเป็นอาหารป้อนเข้า แปรความเข้มข้นของน้ำตาลทรายเท่ากับ 100 200 และ 400 กรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นของสารตั้งต้นเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมกับน้ำตาลทราย (ผลตามข้อ 5.2) และมีค่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม (ผลตามข้อ 5.5) เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.00 ± 0.05 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าออกซิเจนละลายไม่ต่ำกว่า60 เปอร์เซนต์ของอากาศอิ่มตัว ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนโดยโมลของ 3HV และปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือ

5.7 การศึกษาผลของปริมาณ trace element ในอาหารป้อนเข้าต่อการผลิต P(3HB-co-3HV)

ใช้อาหารเพื่อการผลิตเป็นอาหารป้อนเข้า มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (ผลตามข้อ 5.6) และมีอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสม (ผลตามข้อ 5.5) แปรปริมาณ trace element เท่ากับ 1 2 และ 3 มิลลิลิตรต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.00 ± 0.05 ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าออกซิเจนละลายไม่ต่ำกว่า 60 เปอร์เซนต์ของอากาศอิ่มตัว ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโคพอลิเมอร์ สัดส่วนโดยโมลของ3HV และปริมาณสารตั้งต้นที่เหลือ

5.8 การแยกพอลิเมอร์ให้มีสัดส่วนของ 3HV สูงโดยการตกตะกอนพอลิเมอร์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด

ชั่งพอลิเมอร์ที่สกัดได้ 0.5 กรัม ละลายในคลอโรฟอร์ม 100 มิลลิลิตร เติมตัวทำละลายอินทรีย์(อะซิโตน เมทานอล เอทานอล และเฮกเซน) ลงไปช้าๆ คนให้เข้ากัน จนเริ่มเกิดตะกอนขุ่นจึงหยุดเติมตัวทำละลายอินทรีย์ กวนต่อไปอีก30 นาที กรองแยกตะกอนด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ทิ้งไว้จนแห้ง ส่วนน้ำใสนำไประเหยแห้งจนได้พอลิเมอร์ที่เหลือ นำพอลิเมอร์ทั้งสองส่วนมาวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ และสัดส่วนโดยโมลของ3HV

6. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

6.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

นำเซลล์ที่แยกได้จากการปั่นน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม นำเซลล์ที่ได้อบในถ้วยชั่งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

6.2 การวิเคราะห์สัดส่วนโดยโมลของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography หรือ GC)

ตามวิธีของ Comeau และคณะ (1988) โดยทำการปั่นน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำไปอบแห้งที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในหลอดฝาเกลียว เติมคลอโรฟอร์ม 2 มิลลิลิตร เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3% acidified methanol) ปริมาตร2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3.5 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาทีและปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นคลอโรฟอร์ม (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์อยู่ สกัดแยกกรดและกากเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีก 0.5 มิลลิลิตรตามวิธีข้างต้นอีกครั้ง ถ่ายชั้นคลอโรฟอร์มใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟฟี แล้ววิเคราะห์สัดส่วนของโมโนเมอร์และปริมาณโคพอลิเมอร์โดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของ column	:	แคปพิลลารีคอลัมน์ชนิด cabowax-PEG
		เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร

อุณหภูมิของ injector	:	250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	:	130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
อุณหภูมิของ detector (FID)	:	250 องศาเซลเซียส (isothermal)
split ratio	:	50 ต่อ 1
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1 ไมโครลิตร

วิเคราะห์ชนิดของโมโนเมอร์โดยการเปรียบเทียบเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time) ของสารตัวอย่างกับเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารละลายมาตรฐาน PHB และ P(3HB-co-14%3HV) (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

แสดงปริมาณพอลิเมอร์เป็นปริมาณต่อปริมาตรของอาหารที่ใช้เลี้ยง (กรัมต่อลิตร) หรือแสดงเป็นเปอร์เซนต์ของพอลิเมอร์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) คำนวณปริมาณโมโนเมอร์ของ 3HB และ 3HV โดยใช้โปรแกรม Star chromatogram:version 4.02 ซึ่งจะทำการคำนวณปริมาณโมโนเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่นำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงโครมาโตแกรมและกราฟมาตรฐานของสารต่างๆ ในภาคผนวก ค

6.3 การหาปริมาณน้ำตาลทรายในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้เอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสมปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เตส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธีของ Bernfeld (1955) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid หรือ DNSA reagent) (ภาคผนวกที่ ก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างซูโครสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) คำนวณปริมาณซูโครสหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

6.4 การวิเคราะห์หาปริมาณของโพรพิโอเนตและวาเลอเรตโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี

ใช้วิธีของ Ramsay และคณะ (1990) โดยนำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดฝาเกลียว เติมเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 3 (3% acidified methanol) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรที่มีกรดเบนโซอิกเป็นสารมาตรฐานภายในความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นและไดคลอโรมีเทนอย่างละ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงนาน 5 นาทีและปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บชั้นไดคลอโรมีเทน (ชั้นล่าง) ซึ่งมีอนุพันธ์ของเมทิลเอสเทอร์ของโมโนเมอร์ ใส่หลอดฝาเกลียวสำหรับวิเคราะห์ด้วยก๊าซโครมาโตกราฟฟี แล้ววิเคราะห์ปริมาณโพรพิโอเนตและวาเลอเรตโดยวิธีก๊าซโครมาโตกราฟฟี ภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของ column	:	แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 60 เมตร
อุณหภูมิของ injector	:	250 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	:	130 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียสด้วยอัตรา15องศาเซลเซียสต่อนาที รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
อุณหภูมิของ detector (FID)	:	250 องศาเซลเซียส (isothermal)
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	ก๊าซไนโตรเจนอัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาตรที่ฉีด	:	1 ไมโครลิตร

คำนวณปริมาณโพรพิโอเนตและวาเลอเรตโดยโปรแกรม Star chromatogram : version 4.02 ซึ่งจะคำนวณปริมาณโมโนเมอร์โดยมีสารมาตรฐานภายในเป็นกรดเบนโซอิก 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ในภาวะเดียวกัน แสดงโครมาโตแกรมและกราฟมาตรฐานของสารต่างๆ ในภาคผนวก ค

6.5 การหาปริมาณยูเรียในน้ำหมัก

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์แล้ว 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ยูเรียเอส(ภาคผนวก ก) 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที วัดปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่เกิดขึ้น ด้วยหัววัดปริมาณแอมโมเนียมอิออน(ammonium probe) นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณปริมาณยูเรียในหน่วยกรัมต่อลิตร(ภาคผนวก ข)

6.6 การสกัดพอลิเมอร์

ประยุกต์จากวิธีของ Lee, Kim และคณะ (1995) Comeau และคณะ (1988) และ สุชาดา จันทร์ประทีป (2537) โดยทำการปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ทั้งหมดไประเหยแห้ง บรรจุเซลล์แห้งลงในถุงกระดาษกรองเบอร์ 2 เย็บปิดด้วยด้ายทุกด้านให้สนิท นำไปใส่ในส่วนสกัดของชุด Soxhlet apparatus สกัดพอลิเมอร์ด้วยคลอโรฟอร์ม (เซลล์ประมาณ 6 กรัม ต่อคลอโรฟอร์ม 1,500 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 รอบ ระเหยตัวทำละลายออกจนแห้ง

6.7 การศึกษาสมบัติเชิงกลของ P(3HB-co-3HV)

วิเคราะห์สมบัติเชิงกล โดยเครื่อง universal testing machine โดยเตรียมตัวอย่างตามวิธีมาตรฐานของ JIS (K. 7113, K. 7115) ซึ่งกำหนดให้แผ่นฟิล์มมีความกว้าง 6 มิลลิเมตร หนาไม่ต่ำกว่า0.025 มิลลิเมตร และยาว 115 มิลลิเมตร โดยเป็นระยะทดสอบ 40 มิลลิเมตร ดึงด้วยอัตรา 5-50 มิลลิเมตรต่อนาทีจนชิ้นตัวอย่างขาด วิเคราะห์ค่าการต้านแรงดึง (tensile strength) ค่าการยืดจนขาด (elongation to break) และค่า Young's modulus แสดงถึงความแข็งและเปราะ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย